Aus der Fachgruppe für Mykologie und
bakteriologisch-serologische Diagnostik
im Robert-Koch-Institut
des Bundesgesundheitsamtes Berlin
Leiter: Prof. Dr. med., Dr. med. vet. F. Staib

Über die Suche nach Cryptococcus neoformans an Pflanzensamen
Ein Beitrag zur Ökologie und Epidemiologie von Arten der Gattung Cryptococcus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Lutz Altmann
aus Berlin

1976

Aus der Fachgruppe für Mykologie und
bakteriologisch-serologische Diagnostik
im Robert-Koch-Institut
des Bundesgesundheitsamtes Berlin
Leiter: Prof. Dr. med., Dr. med. vet. F. Staib

Über die Suche nach Cryptococcus neoformans an Pflanzensamen
Ein Beitrag zur Ökologie und Epidemiologie von Arten der Gattung Cryptococcus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Lutz Altmann
aus Berlin

Referent: Prof.Dr.med., Dr.med.vet. F. Stai[illegible]

Korreferent: Prof. Dr. F. Lenk

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 19.8.1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Material und Methodik	3
III.	Ergebnisse	25
	A. Vorversuch:	25
	Ausarbeitung einer Methode zur optimalen Isolierung von Cryptococcus-Arten aus vier verschiedenen Saatgemischen	
	B. Hauptversuch:	29
	1. Untersuchung von Samenproben von 117 Pflanzenarten auf Arten der Gattung Cryptococcus	
	2. Untersuchung von Getreide und Getreidestaub aus einem Mühlenbetrieb in Süddeutschland	40
	3. Überleben von Cryptococcus neoformans und Cryptococcus albidus an Pflanzensamen	43
	4. Über die Austrocknungsresistenz der Cryptococcus-Isolate von Pflanzensamen an trockenem Flußsand	46
IV.	Diskussion	47
V.	Zusammenfassung	52
VI.	Literaturverzeichnis	I - VI

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547206_0016

I. Einleitung

Von BUSSE wurde erstmals im Jahre 1894 über die heute als Cryptococcose bekannte Sproßpilzmykose des Menschen berichtet (8, 9). Diese meist tödlich verlaufende Mykose ist durch bevorzugten Befall des Zentralnervensystems (ZNS) gekennzeichnet. Wegen der meist fehlenden Gewebsreaktion ist ihr Verlauf außergewöhnlich heimtückisch und wird somit meist erst durch den Befall des ZNS erkannt. Sie ist weltweit verbreitet und gilt gegenwärtig als eine Inhalationsinfektion. Der Erreger der Cryptococcose ist Cryptococcus neoformans (syn. Torula histolytica) (2, 17, 35, 44, 54).

Interessanterweise gelang wenige Monate nach der Erstbeschreibung dieser Mykose die Isolierung von C. neoformans aus Fruchtsäften durch SANFELICE in Italien (33). Schon er hatte den Verdacht auf Vorliegen einer aerogenen Infektion dieser Säfte durch C. neoformans ausgesprochen. Somit wurde schon damals auf zwei wesentliche Eigenschaften dieses Pilzes hingewiesen und zwar die Austrocknungsresistenz und die Wachstumsfähigkeit in oder auf pflanzlichem Material. Diese beiden Eigenschaften wurden bis zu den Untersuchungen von STAIB (41, 42, 48, 50, 53, 54) nicht in epidemiologische Studien einbezogen. Denn zwischenzeitlich wurde nach der Isolierung von C. neoformans aus Bodenproben und von Vogelfäkalien der hochkonzentrierte Vogelharn (38, 43, 45, 54) als einziger Standort von diesem Erreger berücksichtigt (1, 15, 16, 17, 22, 23, 29, 30, 32, 34, 36, 40).

Einwandfrei konnte geklärt werden, daß in Taubenfäkalien wie auch im Stubenvogelkäfig der Erreger der Cryptococcose vorkommen und hier seinen Standort finden kann. Da C. neoformans in verschiedenstem pflanzlichen Material verwertbare C- und N-Quellen vorfindet, die sogar eine Koloniebildung auf abgestorbenen Pflanzenteilen erlauben, wurden neuerdings auch solche Materialien in die Epidemiologie der Cryptococcose einbezogen (48). Hierbei stellte sich auch die Frage, inwieweit Vogelfutter in Form von Pflanzensamen als Träger von C. neoformans infrage kommen kann. Die Suche nach diesem Pilz an diesem Material schien berechtigt, eben wegen seiner außergewöhnlich hohen Austrocknungsresistenz.

Darüber hinaus war auch von Interesse, ob Pflanzensamen bei seiner verschiedenartigsten Verarbeitung als eine Infektionsquelle von C. neoformans für den Menschen infrage kommen kann. Zusätzlich sollte im Rahmen dieser Untersuchungen geprüft werden, ob und welche anderen Arten der Gattung Cryptococcus an diesem Material vorkommen (13, 14, 18, 19).

Da C. neoformans als einzige Spezies der Gattung Cryptococcus für den Menschen pathogen ist, werden die übrigen auch als "apathogene Cryptococcus-Arten" bezeichnet (27, 28, 31, 38).

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits in einer Kurzmitteilung veröffentlicht (51).

II. Material und Methodik

Da zu Beginn unserer Untersuchungen über Vorkommen und Verbreitung der hier interessierenden Pilze an Pflanzensamen keine Befunde anderer vorlagen, und wir über keine speziellen botanischen Kenntnisse verfügten, sollten die Samenproben nach Methoden verarbeitet werden, wie sie in der Medizinischen Mikrobiologie bei Anzuchtsversuchen von Keimen, insbesondere Krankheitserregern üblich sind.

Da sich angetrocknete Cryptokokken bei Benetzung sofort von der Unterlage lösen und in Suspension gehen (47), entschieden wir uns für folgenden Verarbeitungsgang:

Bestimmte Mengen der Samenproben wurden vergleichend in Aqua dest. und das Pilznährmedium SABOURAUD-Dextrose-Lösung in Erlenmeyerkolben gegeben. Wegen der Quellung der Samen in Flüssigkeiten wurde auch nach einem optimalen Mengenverhältnis von Samen und Suspensionsmedium gesucht. Hierbei wurden 15-20 g Samen in folgende Flüssigkeitsmengen gegeben: 10, 20, 30, 40 ml. Wegen eines zu erwartenden konkurrierenden Keimwachstums in den gewählten Medien bei 26°C wurden hiervon die Abimpfungen zur Anzucht der gesuchten Pilze innerhalb von 2-48 Stunden vorgenommen. Ausgeimpft pro Petrischale (Durchmesser 80 mm) wurden ca. 0,05 ml der Suspension. Als feste Nährmedien wurden gewählt: SABOURAUD-Dextrose-Agar (mit Zusätzen von Penicillin und Streptomycin) (s. hierzu Nährmedien) und Guizotia abyssinica-Kreatinin-Agar (mit Zu-

sätzen von Penicillin, Streptomycin und Diphenyl).

Die Bebrütung der so beimpften Nährböden erfolgte bei 26°C über einen Zeitraum bis zu ca. 10 Tagen. Während dieser Beobachtungszeit erfolgten laufend Abimpfungen interessierender Pilzkolonien. Hierbei wurde schon bei der makroskopischen Beurteilung des Keimwachstums nach den für die Gattung Cryptococcus typischen Kolonieformen gesucht. Hierunter versteht man nach dem gegenwärtigen Stand der Systematik runde, glattrandige, pastöse, weiße, teils trockene, teils muköse Kolonien, bestehend aus runden bis ovalen Zellen mit einem Durchmesser von 6-8 µ. Nur diese Kolonieformen wurden weiter untersucht und anhand folgender Eigenschaften identifiziert:

1. Wachstumstemperatur 26°C - 37°C;
2. Harnstoffhydrolyse;
3. Dextrosegärung;
4. Kohlenhydrat-Assimilationsprüfung mit Dextrose, Galaktose, Maltose, Laktose, Saccharose;
5. Stickstoff-Assimilationsprüfung mit Kreatinin und Kaliumnitrat;
6. Wuchsformprüfung auf Kartoffelwasseragar in der Objektträger-Kultur;
7. Untersuchung auf Braunfärbeeffekt auf Guizotia abyssinica-Kreatinin-Agar.

Neben der Verarbeitung des ganzen Samenkorns bei der Suche nach C. neoformans prüften wir auch das im elektrischen Mixgerät zerkleinerte Samenkorn. Ungeachtet der Tatsache, daß bei dieser Verarbeitung keimhemmende Substanzen in Lösung gehen, war hier allein der mögliche nutritive Wert von Inhaltsstoffen wie bei der Saat der Komposite Guizotia abyssinica für C. neoformans von Interesse (4, 39).

Bei der Suche nach C. neoformans am Samenkorn setzten wir voraus, daß dieser Pilz an diesem Material überleben kann. Wir infizierten deshalb Samen verschiedener Pflanzenarten mit einem C. neoformans-Stamm (aus Vogelkot isoliert (38)) und mit einem Stamm von C. albidus (von Pflanzensamen). Zum Vergleich wurde auch Flußsand mit von Pflanzensamen isolierten apathogenen Cryptococcus-Arten infiziert, anschließend getrocknet und 700 Tage lang bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Infektion dieser Materialien erfolgte mit Keimaufschwemmungen, deren Dichte um 2×10^7/ml lag. Die hierfür benutzten Kulturen wurden 2 Tage/26°C auf SABOURAUD-Dextrose-Agar gezüchtet.

Nach der Beretzung der Samen- und Sandproben wurden diese unter aseptischen Kautelen im Exsiccator getrocknet (2 Tage/Zimmertemperatur) und dann in mit Gummistopfen verschlossenen Reagenzgläsern bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Für die Prüfung auf Lebensfähigkeit der Keime wurden vor den infi-

zierten Proben auf Guizotia abyssinica-Kreatinin-Agar und SABOURAUD-Dextrose-Agar ausgestreut und das Ganze bei 26°C belassen. Im Falle des Vorhandenseins vermehrungsfähiger Keime wurde die Koloniebildung um das Samen- oder Sandkorn verfolgt (s. Abb. 1-5) und dem genannten Untersuchungsgang entsprechend wieder eine Identifizierung vorgenommen.

Untersuchte Pflanzensamen

Vorversuch mit 4 Saatgemischen:

1. Saatgemisch: Mannehirse, Senegal, La-Plata-Hirse, Silberhirse, Spicksaat. (Kanarienvogelsingfutter aus Berlin-West).

2. Saatgemisch: Senegal, Marokkohirse, La-Plata-Hirse, Silberhirse, Dakota, Spicksaat, geschälter Hafer. (Wellensittichfutter aus Berlin-West).

3. Saatgemisch: Verschiedene, nicht näher definierte Hirsearten. (Wellensittichfutter aus Berlin-West).

4. Saatgemisch: Sonnenblume, Hirse, Raps, Rübsamen, Hanf, weißer Mohn, Negersaat, Thimotee. (Waldvogelfutter aus Berlin-West).

Hauptversuch:

1. Samenproben von 117 Arten aus 48 Familien (Botanischer Garten und Pflanzenphysiologisches Institut in Berlin-West).

Aizoaceae	Nr.	1	Tetragonia tetragonoides (Pall.) O.Kuntze neuseeländ.Spinat
Amaranthaceae	"	2	Amaranthus caudatus L. Fuchsschwanz
	"	3	Celosia argentea L. Hahnenkamm
Anacardiaceae	"	4	Rhus typhina L. Hirschkolben-Sumach
Aquifoliaceae	"	5	Ilex decidua Walt. Winterbeere
Araceae	"	1P	Arum Aronswurz
Aristolochiaceae	"	6	Aristolochia macrophylla Lam. Pfeifenwinde
Boraginaceae	"	54	Cynoglossum microglochin Benth. Hundszunge
	"	7	Mertensia sibirica (L.) Don Lungenwurz
	"	8	Myosotis sylvatica (Ehrh.) Hoffm. "Rosea" Vergißmeinnicht
Campanulaceae	"	33	Campanula latifolia L. Glockenblume
Caprifoliaceae	"	9	Lonicera alpigena L. Geißblatt
	"	27	Sambucus racemosa L. Holunder
	"	10	Symphoricarpos orbiculatus Moench. A. Gray Schneebeere

Caprifoliaceae	Nr.	11	Viburnum lantana L. Schlinge
Caryophyllaceae	"	12	Arenaria fendleri A. Gray Sandkraut
	"	13	Dianthus deltoides L. Nelke
	"	14	Gypsophila paniculata L. Schleierkraut
	"	12P	Melandrium Abendlichtnelke
Celastraceae	"	15	Celastrus scandens L. Baumwürger
Chenopodiaceae	"	16	Artiplex hortensis L. Gartenmelde
	"	3P	Chenopodium Gänsefuß
	"	18P	Spinatia Spinat
Cistaceae	"	17	Helianthemum italicum (L.) Pers. Sonnenröschen
Compositae	"	18	Achillea millefolium subsp. alpestre (Jacq. Berger) L. Schafgarbe
	"	19	Ageratum corymbosum Lucc. Leberbalsam
	"	9P	Anthemis Kamille
	"	20	Aster alpinus L. Sternblume
	"	21	Centaurea bella Trautv. Kornblume
	"	22	Cnicus benedictus L. Cardobenedictenkraut
	"	17P	Helianthus Sonnenblume

Compositae	Nr.	23	Hieracium sabaudum L. Habichtskraut
	"	24	Lactuca serriola Torner Spargelsalat
	"	25	Solidago arguta Ait. Goldrute
	"	26	Tagetes erecta L. Studentenblume
Convolvulaceae	"	28	Convolvulus tricolor L. Trichterwinde
Cornaceae	"	29	Cornus alba L. Kornelkirsche
Crassulaceae	"	30	Sedum populifolium Pall. Fetthenne
Cruciferae	"	31	Alyssum saxatile L. Steinkraut
	"	32	Brassica napus L. var. napus Kohl
	"	33	Cochlearia officinalis L. Löffelkraut
	"	34	Erysimum perofskianum Fisch et Mey Alpenlack
	"	35	Iberis umbellata L. Schleifenblume
	"	9P	Isatis Waid
	"	11P	Sinapis Senf
Cucurbitaceae	"	10P	Cucurbita Kürbis
Euphorbiaceae	"	36	Euphorbia dulcis L. Wolfsmilch
	"	7P	Euphorbia Wolfsmilch

Geraniaceae	Nr.	37	Geranium pratense L. Storchschnabel
Gramineae	"	7P	Panicum Hirse
	"	11P	Zea Mais
Guttiferae	"	38	Hypericum hirsutum L. Johanniskraut
Hydrophyllaceae	"	40	Phacelia tanacetifolia Benth. Bienenweide
Labiatae	"	41	Ocimum canum Sims Basilikum
	"	42	Origanum vulgare L. Majoran
	"	13P	Perilla Perille
	"	43	Salvia glutinosa L. Salbei
Leguminosae	"	44	Amorpha fructicosa L. Bastardindigo
	"	45	Caragana arborescens Lam. Erbsenstrauch
	"	46	Coluta orientalis Mill. Blasenstrauch
	"	47	Coronilla coronata Nathorst Kronwicke
	"	48	Cytisus sessilifolius L. Geißklee
	"	49	Genista tinctoria L. Ginster
	"	50	Hedysarum hedysaroides (L.) Schinz et Thell Hahnenkopf
	"	51	Laburnum alpinum (Mill.) Bercht et Presl Goldregen

Leguminosae	Nr.	52	Lathyrus aphaca L. Platterbse
	"	53	Lupinus micranthus Dougl. Lupine
	"	4P	Pisum Erbse
	"	55	Vicia dumetorum L. Saubohne
Linaceae	"	56	Linum flavum L. Lein
Lythraceae	"	57	Lythrum virgatum L. Weiderich
Malvaceae	"	58	Hibiscus syricus L. Eibisch
	"	59	Malva alcea L. Malve
Moraceae	"	2P	Canabis Hanf
Oleaceae	"	60	Ligustrum compactum Hook. f. et Thoms ex Brandis Rainweide
Papilionaceae	"	6P	Phasedus Feuerbohne
Polygonaceae	"	61	Polygonum bistorta L. Knöterich
	"	62	Rumex pulcher L. Sauerampfer
	"	14P	Rumex Sauerampfer
Primulaceae	"	63	Primula auricula L. Primel
Ranunculaceae	"	64	Caltha palustris L. Sumpfdotterblume
	"	15P	Delphinium Rittersporn

Ranunculaceae	Nr.65	Nigella arvensis L. Jungfer im Grünen
	" 66	Ranunculus acer L. Hahnenfuß
	" 67	Trollius asiaticus L. Goldranunkel
Resedaceae	" 68	Reseda lutea L. Reseda
Rosaceae	" 69	Cotoneaster multiflorus Bunge Zwergmispel
	" 70	Crataegus viridis L. Weißdorn
	" 71	Potentilla fructicosa L. Fünffingerstrauch
	" 72	Pyracantha coccinea Roem. Feuerdorn
	" 73	Rosa cinnamomea L. Rose
	" 74	Sorbus reflexipetala Koehne Eberesche
Rutaceae	" 75	Ptelea trifoliata L. Hopfenstrauch
Saxifragaceae	" 76	Deutzia schneideriana Rehd. Deutzie
	" 77	Philadelphus coronarius L. Jasmin
Scrophulariaceae	" 78	Digitalis purpurea L. Fingerhut
	" 79	Mimulus cardinalis Dougl. Gauklerblume
	" 80	Verbascum blattaria L. Königskerze
	" 81	Veronica [illegible] L. [illegible]

Solanaceae	Nr.81	Lycium ruthenicum Murr. Bocksdorn
	" 82	Nicotiana rustica L. ..... tabak
	" 19P	Nicotiana Tabak
Thymelaeaceae	" 83	Daphne mezereum L. Seidelbast
Tiliaceae	" 84	Tilia tomentosa Moench Linde
Tropaeolaceae	" 85	Tropaeolum majus L. Kapuzinerkresse
Umbelliferae	" 86	Carum carvi L. Kümmel
	" 87	Chaerophyllum aromaticum L. Kerbelrübe
	" 88	Daucus carota L. Mohrrübe
Gramineae	" 89	Elymus virginicus L. Strandhafer
	" 90	Glyceria canadensis (Michx.) Trin. Süßgras
	" 91	Phalaris arundinaceae L. Bandgras
Liliaceae	" 92	Allium aflatunense B. Fedtsch. Lauch
	" 93	Asparagus maritimus Mill. Spargel
Typhaceae	" 94	Typhax glauca Godr. Rohrkolben
Cornaceae	" 95	Cornus capitata Wall. Kornelkirsche
Guttiferae	" 96	Hypericum canariense L. Johanniskraut
Labiatae	" 97	Teucrium flavum L. Gamander

2. Achtzehn Proben von Getreide, Getreidespelzen, -staub und Ackerbohnen aus Süddeutschland.

Nr.	1A	Sommerweizen-Adler	(Sommerhausen/Main)
"	2A	Winterweizen Diplomat	(Marbach/Neckar)
"	3A	Durch Sieb getrennter Weizen-Abfall "Schrollen"	(Uhingen/Württbg.)
"	4A	Staub von Winterweizen	(Uhingen/Württbg.)
"	5A	Durch Belüftung entfernter Abfall, Spelzen und Schalenteile	(Uhingen/Württbg.)
"	6A	Staub von Canada Western Red Spring Weizen	(Canada)
"	7A	Canada Western Red Spring Weizen	(Canada)
"	8A	Winterweizen Jubilar	(Augsburg)
"	9A	Sommerweizen	(Vaihingen/Enz.)
"	10A	Gerste	(Eckwälden/Württbg.)
"	11A	Weizen	(Bad Boll)
"	12A	Weizen	(Bad Boll)
"	13A	Weizen, Gerste, Hafer	(Bad Boll)
"	14A	Weizen	(Eckwälden/Württbg.)
"	15A	Gerste, Hafer	(Bad Boll)
"	16A	Gerste, Hafer	(Eckwälden/Württbg.)
"	17A	Gerste	(Bad Boll)
"	18A	Mais	(Bad Boll)

Nährmedien für Anzucht und Identifizierung der isolierten Sproßpilze:

SABOURAUD-Dextrose-Agar:

Aqua dest. 1000 ml, Dextrose 40 g, Bacto-Pepton (Difco) 10 g, Agar 15 g; 20 Min. Dampftopf, anschließend 15 Min./110°C. Zur Hemmung störender Begleitbakterien erfolgte ein Zusatz von einer Antibiotica-Kombination. Nach Abkühlen des Nährbodens auf ca. 50°C wurden Streptomycinsulfat (40 E/ml) und Penicillin G (20 E/ml) zugegeben, ausreichend gemischt und das Ganze anschließend in Petrischalen gegossen.

Verwendung:

Dieser Nährboden diente neben dem Differentialnährboden Guizotia abyssinica-Kreatinin-Agar zur Anzucht der Sproßpilze aus dem Untersuchungsmaterial zur Isolierung und Wachstumsbeurteilung.

SABOURAUD-Dextrose-Lösung:

Dieselbe Zusammensetzung und Herstellungsweise wie SABOURAUD-Dextrose-Agar, nur ohne Agar.

Verwendung:

Das in Erlenmeyerkolben (100 ml fassend) abgefüllte Nährmedium diente zur Anreicherung von Sproßpilz-Zellen, die an der unzerkleinerten oder zerkleinerten Saat gesucht wurden.

Guizotia abyssinica-Kreatinin-Agar (39, 46):

Differentialnährboden für Cryptococcus neoformans:

50 g Samen der Komposite Guizotia abyssinica (in Vogelhandlungen unter der Bezeichnung Negersaat erhältlich) werden mit einem elektrischen Mixer feinst zerkleinert und 1000 ml Aqua dest. zugesetzt; das Ganze wird 30 Min. gekocht, anschließend durch ein Papierfilter filtriert und dem Filtrat Aqua dest. auf eine Endmenge von 1000 ml zugegeben. Diesem Filtrat (1000 ml) werden folgende Substanzen zugesetzt: Dextrose 1o g, KH_2PO_4 1 g, Kreatinin 1 g, Agar 15 g. Anschließend wird das Ganze 25 Min./110°C belassen und danach in Petrischalen gegossen. Der Nährboden ist farblos und durchsichtig; sein pH-Wert beträgt ca. 5,5.

Im Hinblick auf eine störende Begleitflora können Bakterien- und Schimmelpilz-hemmende Substanzen zugesetzt werden. Nach Abkühlen des Nährbodens auf ca. 50°C wurden für vorliegende Versuche Streptomycinsulfat (40 E/ml) und Penicillin G (20 E/ml) zugesetzt. Zur Hemmung störender Schimmelpilze genügt Diphenyl in einer Konzentration von 0,1 %; 1 g Diphenyl in 20 ml absolutem Alkohol gelöst, werden 1000 ml Nährboden zugegeben und nach ausreichendem Mischen in Petrischalen gegossen.

Anwendung:

Auf diesem Differentialnährboden (39) kommt es nur bei den Kolonien von C. neoformans zu einer Braunverfärbung, genannt auch Braunfarbeffekt (BFE). Diese Farbreaktion gilt als spezifisch und wird auch in dichtester Nachbarschaft anderer Pilzarten nicht beeinflußt. Wegen dieser Spezifität bot sich dieser Nährboden für vorliegende Untersuchungen in besonderem Maße an. Nur unter diesen methodischen Voraussetzungen ist die Suche nach C. neoformans in großen Probenmengen möglich. Der BFE tritt bei einzelstehenden Kolonien von C. neoformans nach ca. 5 Tagen/26°C auf; bei einem dichten Kolonierasen von C. neoformans ist der BFE schon nach 2 Tagen/26°C möglich.

Dextrose-Gärmedium:

Dextrose 1 %, Pepton (Fa. BRUNNENGRÄBER, Lübeck) 1,0 %, NaCl 0,5 %, Leitungswasser; das Ganze an zwei aufeinanderfolgenden Tagen je 30 Min./100°C. Indikator: Bromthymolblau, von 0,1 %iger Stammlösung 2,5 ml in 100 ml Nährlösung, Endp$_H$-Wert ~ 7,0 und Ausgangsfarbe blau. Die Lösung ist in Mengen zu 3 ml in Glasröhrchen (lichte Weite 8 mm) abgefüllt; diese enthalten Röhrchen (lichte Weite 4 mm) zum Nachweis von Gasbildung. Das Ganze ist mit maschinell hergestellten Papierstopfen verschlossen. Beobachtungszeit der beimpften Röhrchen 7 Tage/26°C.

Verwendung:

da die Gattung Cryptococcus durch fehlende Gärfähigkeit gekennzeichnet ist, genügt den Gärregeln entsprechend, die alleinige Prüfung auf Dextrose-Vergärung.

Assimilationsprüfung:

Bei der Identifizierung von Arten der Gattung Cryptococcus kommt der sog. Assimilationsprüfung besondere Bedeutung zu. Aus den verschiedenen Verfahren wählten wir das nach BEIJERINCK (5, 27). Hierbei wurde die Kohlenhydrat- und Stickstoff-Assimilationsprüfung durchgeführt. Folgende Zukker standen zur Diskussion: Dextrose, Maltose, Laktose, Saccharose und Galaktose. Bei der Stickstoff-Assimilationsprüfung fanden die beiden Substanzen Kaliumnitrat und Kreatinin Verwendung.

Herstellung des Basisnährbodens für die Kohlenhydrat-Assimilationsprüfung:

$(NH_4)_2SO_4$	0,5 %
KH_2PO_4	0,1 %
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,05 %
Agar	2 %

Aqua dest.

Das Ganze 15 Min./110°C.

Herstellung des Basisnährbodens für die Stickstoff-Assimilationsprüfung:

Dextrose	2	%
KH_2PO_4	0,1	%
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,05	%
Agar	2	%

Aqua dest.

Das Ganze 15 Min./110°C.

Durchführung der Assimilationsprüfung:

Die Sproßpilz-Reinkulturen werden 48 Std./26°C auf SABOURAUD-Dextrose-Agar (ohne Antibiotica-Zusatz) vorgezüchtet. Das Kulturmaterial wird in 0,85 %iger NaCl-Lösung aufgeschwemmt. Hierbei sollte die Keimdichte um ca. 2×10^7/ml betragen. Von dieser so eingestellten Suspension werden 1 ml mit 10 ml des auf ca. 50°C abgekühlten Grundsubstrats zusammen mit 0,025 ml Protovita (Vitaminpräparat, Fa. HOFFMANN-LA ROCHE, Grenzach/Baden) in Petrischalen gemischt. Nach Erstarren werden die halb geöffneten Schalen zwecks Beseitigung von Kondenswasser mit der Nährbodenoberfläche nach unten für 2 Std./26°C belassen. Anschließend erfolgt der Auftrag der zu prüfenden Substanzen. Bei der N-Assimilationsprüfung arbeitet man mit dem N-freien und bei der C-Assimilationsprüfung mit dem C-freien Grundsubstrat.

Wird die aufgetragene Substanz vom zu prüfenden Keim verwertet, sind in ihrem Diffusionsbereich die Nährbedingungen voll erfüllt, und es entstehen aus den einzelnen vorgelegenen Zellen Mikrokolonien, was eine Trübung dieses Bereichs zur Folge hat; dieser Wachstumsbereich wird auch als Auxanogramm bezeichnet. Diese Auxanogramme sind u.U. schon nach 8 - 10 Stunden ablesbar. Die endgültige Beurteilung erfolgte nach 4 Tagen/26°C.

Verwendung:
Da die Arten der Gattung Cryptococcus über keine Gärfähigkeit verfügen, kommt der oxydativen Zuckerverwertung ein besonderer diagnostischer Wert zu.

Bei der Stickstoff-Assimilationsprüfung ist KNO_3 bei der Identifizierung der sog. apathogenen Cryptococcus-Arten von diagnostischer Bedeutung. Für die Identifizierung von C. neoformans ist das Kreatinin-Auxanogramm obligat(38, 42). Deshalb ist diese Methode bei vorliegender Studie auch eine zusätzliche Kontrolle für den BFE auf Guizotia abyssinica-Kreatinin-Agar.

Harnstoff-Agar (nach CHRISTENSEN):

Pepton	0,1 %
Dextrose	0,1 %
NaCl	0,5 %
KH_2PO_4	0,2 %
Agar	2,0 %
End-pH-Wert	6,8.

Zu 1000 ml Grundsubstrat 1 ml einer 1 %igen Phenolrotlösung. Das Ganze wird in Reagenzgläser in Mengen von je 4,5 ml abgefüllt und 15 Min./1,1 atü belassen. Zu je 4,5 ml des noch flüssigen, abgekühlten Nährbodens werden 0,5 ml einer seitzfiltrierten 20 %igen Harnstoff-Lösung zugesetzt und dann schräg gelegt (Schrägagar). Die Ausgangsfarbe des Nährbodens ist gelb; bei Harnstoffhydrolyse schlägt die Farbe des ganzen Nährbodens in rot um. Die Beobachtungszeit dieses auf der Schrägfläche und im Stich beimpften Nährbodens sollte mindestens bis 10 Tage/26°C betragen.

Verwendung:

Da sämtliche Arten der Gattung Cryptococcus durch positive Harnstoffhydrolyse gekennzeichnet sind, ist diese Prüfung eine wertvolle Suchmethode.

Kartoffelwasser-Agar:

für die sog. Objektträger-Kultur zum Studium der Morphologie bzw. Wuchsform von Sproßpilzen.

Nach LODDER and KREGER-VAN RIJ (27) wird dieser Nährboden wie folgt hergestellt:
230 ml Kartoffelwasser, 770 ml Leitungswasser, 20 g Dextrose und 20 g Agar.
Herstellung des Kartoffelwassers: 100 g geschälte, gewaschene und gemahlene Kartoffeln werden mit 300 ml Leitungswasser kühl stehen gelassen (1 Tag). Dann wird dieses Material durch ein Tuch gepreßt und das anschließend gewonnene Filtrat 60 Min./115°C belassen. Dem so hergestellten Kartoffelwasser werden dann die oben genannten Substanzen zugesetzt und das Ganze 15 Min./120°C belassen. Der Nährboden wird in kleinen Portionen (z.B. 20 ml/Reagenzglas) im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt und kurz vor Gebrauch wieder durch Erwärmen verflüssigt. In einer Petrischale wird auf ein gebogenes Glasstäbchen ein sauberer Objektträger gelegt (waagerecht!), Schale mit Objektträger werden sterilisiert. Nach dem Abkühlen taucht man den Objektträger mit steriler Pinzette in den flüssigen Kartoffelwasser-Agar und legt ihn in die Petrischale zurück. Der erstarrte dünne Nährbodenfilm wird in Form von 2 I pfstrichen mit dem Kulturmaterial beimpft. Auf diese Impfstriche legt man sterile Deckgläser. Um eine Austrocknung zu verhindern, gibt man in die Schalen genügend

steriles Wasser (feuchte Kammer). Nach 7-tägiger Bebrütung bei 26°C werden diese Objektträger-Kulturen endgültig mikroskopisch beurteilt.

Verwendung:

Nach dem gegenwärtig noch gültigen Stand der Systematik ist die Gattung Cryptococcus morphologisch durch fehlende Bildung von Myzel oder Pseudomyzel in der Objektträgerkultur charakterisiert. Da sämtliche C. neoformans-Isolate von Patienten und von Untersuchungsmaterialien von der freien Natur über diese morphologische Eigenschaft verfügten, wurde die fehlende Myzel- bzw. Pseudomyzelbildung als wesentliches diagnostisches Kriterium bei der Suche und Identifizierung von C. neoformans herangezogen.

Dieser Hinweis erscheint deshalb berechtigt und erforderlich, da gegenwärtig C. neoformans als Basidiomycet diskutiert wird (17, 37). Hierzu wird in der Diskussion Stellung genommen.

III. Ergebnisse

A. Vorversuch

Ausarbeitung einer Methode zur optimalen Isolierung von Cryptococcus-Arten aus vier verschiedenen Saatgemischen:

Wie in der Methodik darauf hingewiesen, war zuerst die Entscheidung für eine bestimmte Verarbeitungsmethode des Untersuchungsmaterials notwendig. Bei der mykologischen Untersuchung von 4 Saatgemischen, die nach 10 verschiedenen Methoden verarbeitet wurden, konnten verschiedene Isolierungsbefunde erhoben werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Wie aus den Befunden hervorgeht, erwies sich die Methode Nr. VI als optimal. Wir entschlossen uns, nach dieser Technik sämtliche zu untersuchenden Samenproben der verschiedensten Pflanzenarten und Pflanzenteile (Spelzen, Schalenteile, Getreidestaub u.a.) zu verarbeiten. Bei dieser Technik wurde wie folgt verfahren:

15-20 g Samen wurden in 30 ml SABOURAUD-Dextrose-Lösung 22 Std./26°C belassen und anschließend hiervon ca. 0,05 ml auf SABOURAUD-Dextrose-Agar und Guizotia abyssinica-Kreatinin-Agar ausgeimpft und das Ganze anschließend bei 26°C belassen.

Von den 4 untersuchten Vogelfutterproben (Pflanzensamengemische) konnte aus 3 Proben die apathogene Cryptococcus-Art C. albidus reichlich isoliert werden. C. neoformans

konnte nicht nachgewiesen werden.

Zu der Frage: warum bei den übrigen Methoden keine bzw. nur in geringer Menge Pilze nachgewiesen werden konnten, kann unsererseits nicht Stellung genommen werden.

Tabelle 1

Ausarbeitung einer Methode zur optimalen Isolierung von Cryptococcus-Arten aus vier verschiedenen Saatgemischen

Anreicherungsmethode Nr.	Aufschwemmungsmedium des Samens: Sab.-Dex.-Lösung	Aufschwemmungsmedium des Samens: Aqua dest.	Menge ml	Beschaffenheit des Samens: gemahlen	Beschaffenheit des Samens: ungemahlen	Bebrütungszeit der Aufschwemmung Std./26°C	Kulturversuch auf SDA	Kulturversuch auf GAKA	Cryptococcus-Isolierung aus Saatgemisch Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4
I		.	10		.	?	.	.	-	+	+	+
II		.	20	.		?	.	.	-	-	-	-
III		.	10		.	22	.	.	-	-	-	-
IV		.	20	.		22	.	.	+	-	-	-
V	.		20	.		22	.	.	-	-	-	-
VI	.		30		.	22	.	.	-	+++	+++	+++
VII	.		40	.		24	.	.	-	-	-	-
VIII		.	10		.	48	.	.	-	-	-	-
IX		.	20	.		48	.	.	-	-	-	-
X	.		30		.	48	.	.	-	-	-	-

Zeichenerklärung:

Nr. I - X	= 10 verschiedene Verarbeitungsmethoden und die hierbei erzielte Isolierung von Cryptococcus-Arten
SDA	= Kulturversuch mit Hilfe von SABOURAUD-Dextrose-Agar
GAKA	= Kulturversuch mit Hilfe von Guizotia abyssinica-Kreatinin-Agar
Nr. 1 - 4	= Numerierung der vier untersuchten Saatgemische
+	= 1 - 10 Kolonien
+++	= Dichter Kolonierasen
-	= Keine Isolierung von Cryptococcus spec.
.	= Gewählte Methode

B. Hauptversuch

1. Untersuchung von Samenproben von 117 Pflanzenarten auf Arten der Gattung Cryptococcus.

Nach der im Vorversuch geprüften Methode wurden die Proben verarbeitet. Die Identifizierung der Cryptococcus-verdächtigen Isolate erfolgte nach den Kriterien wie sie in den nachfolgenden tabellarischen Übersichten zusammengefaßt sind.

Vom Samen von 117 Pflanzenarten gelang der Nachweis folgender Arten der Gattung Cryptococcus:

1. C. albidus (30 mal)
2. C. albidus zusammen mit C. albidus var. diffluens (5 mal)
3. C. albidus zusammen mit C. laurentii (1 mal)
4. C. albidus var. diffluens (7 mal)
5. C. albidus var. diffluens zusammen mit C. laurentii (1 mal)
6. C. laurentii (2 mal)
7. C. terreus (1 mal)

(s. Tab. 2).

Abbildung 1

Samen von Celosia argentea L. (Hahnenkamm) mit Cryptococcus neoformans W 71 infiziert, nach 700 Tagen bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Zur Feststellung von noch wachstumsfähigen C. neoformans-Zellen wurde der Samen auf SABOURAUD-Dextrose-Agar ausgestreut.

Im Bild: Auskeimende Samenkörner sind umgeben von einer C. neoformans-Kolonie.

Tabelle 2

Identifizierung von Cryptococcus-Arten aus 117 Pflanzensamen-Proben

Saat Nr.	Koloniebild	Wachstum bei 37°C	Wachstum bei 26°C	Harnstoff-Hydrolyse	Dextr.-Vergärung	Assimil.-Prüfung - C - D	M	L	S	G	- N - NH_4	KNO_3	Myc.	BFE	Cryptococcus-Art
1	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C.albidus
2	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C.albidus
7	weiß, mukös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C.albidus
8a	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C.albidus
8b	weiß, mukös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C.albidus
12a	weiß, mukös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C.albidus
12b	weiß, mukös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	C.laurentii
13	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	C.alb. var. diffluens
14	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	C.laurentii
16	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	C.terreus
17	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C.albidus
20	weiß, mukös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C.albidus
21	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	C.alb. var. diffluens
22	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C.albidus
25	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C.albidus
26	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C.albidus
27	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C.albidus
31	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	C.alb. var. diffluens
32	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C.albidus
35	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	C.alb. var. diffluens
36	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	C.albidus
39a	weiß, mukös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C.albidus
39b	weiß, mukös	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	C.alb. var. diffluens

Tabelle 2

Saat Nr.	Koloniebild	Wachstum bei 37°C	Wachstum bei 26°C	Harnstoff-hydrolyse	Dextr.-Vergärung	Assimil.-Prüfung - C - D	M	L	S	G	- N - NH4	KNO3	Myz.	BFE	Cryptococcus-Art
40	weiß, mukös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	C.laurentii
42	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	C.alb. var. diffluens
47	weiß, mukös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C.albidus
49	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C. albidus
50	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C. albidus
54	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C. albidus
61	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C. albidus
62a	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C. albidus
62b	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	C.alb. var. diffluens
65a	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	C. alb. var. diffluens
65b	weiß, mukös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C. albidus
66	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	C.alb. var. diffluens
68a	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	C.alb. var. diffluens
68b	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C. albidus
70	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C. albidus
71	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C. albidus
73	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C. albidus
77	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C. albidus
79	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C. albidus
88	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C. albidus
90	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C. albidus
2P	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	C.alb. var. diffluens

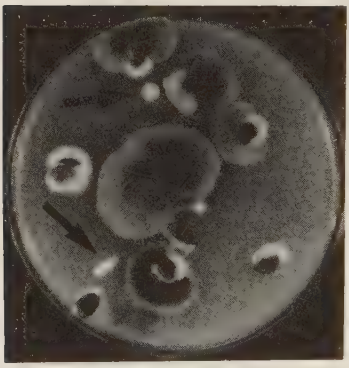
Tabelle 2

Saat Nr.	Koloniebild	Wachstum bei 37°C	Wachstum bei 26°C	Harnstoff-hydrolyse	Dext.-Vergärung	Assimil.-Prüfung - C - D	M	L	S	G	- N - NN	KNO_3	Myz.	BFE	Cryptococcus-Art
3P	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C. albidus
6P	weiß, mukös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C. albidus
8P	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C. albidus
9P	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C. albidus
10P	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C. albidus
12Pa	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	C.alb. var. diffluens
12Pb	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C. albidus
14Pa	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	C.alb. var. diffluens
14Pb	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	C.laurentii
17P	weiß, pastös	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	C. albidus

Zeichenerklärung :

D = Dextrose
M = Maltose
L = Lactose
S = Saccharose
G = Galactose
NN = Kreatinin
BFE = Braunfarbeffekt
C = Kohlenhydrat
N = Stickstoff

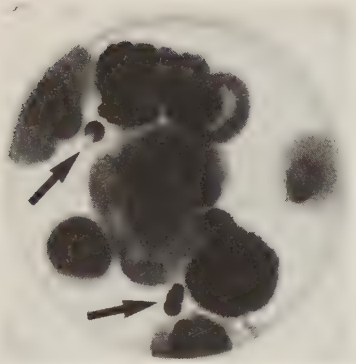
Abbildung 2



Samen von Hedysarum hedysaroides (L.) Schinz et Thell (Hahnenkopf) mit Cryptococcus neoformans W 71 infiziert und 700 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt: Zur Feststellung von noch wachstumsfähigen C. neoformans-Zellen wurde der Samen auf Guizotia abyssinica-Kreatinin- Agar (ohne Diphenyl-Zusatz) ausgestreut und das Ganze bei 26°C bebrütet.

Im Bild: Nach 4 Tagen (26°C) an den Samenkörnern Fadenpilz- und Sproßpilzkolonien. Die Sproßpilzkolonien (s.Pfeil) mit noch fehlendem Braunfarbeffekt (BFE) erwiesen sich als C. neoformans. Vergleiche BFE derselben Kolonien nach 7 Tagen/26°C bei Abb. 3.

Abbildung 3



Samen von Hedysarum Hedysaroides (L.) Schinz et Thell (Hahnenkopf) mit Cryptococcus neoformans W 71 infiziert und 700 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Zur Feststellung von noch wachstumsfähigen Zellen von C. neoformans wurde der Samen auf Guizotia abyssinica-Kreatinin-Agar (ohne Diphenyl-Zusatz) ausgestreut und bei 26°C belassen. Neben des fehlenden Diphenyl-Zusatzes üppiges Wachstum von Hyphomyceten.

Im Bild: Nach 7 Tagen/26°C sind die einzeln stehenden sproßpilzkolonien dunkelbraun verfärbt. Es handelt sich hierbei um den Braunfarbeffekt (BFE) von C. neoformans.

Vorkommen und Verteilung der isolierten Cryptococcus-Arten bei den untersuchten Pflanzensamen

C. albidus:

Aizoaceae:	Tetragonia tetragonoides (Pall.)
Amaranthaceae:	Amaranthus caudatus L.
Boraginaceae:	Cynoglossum microglochin Benth.
	Mertensia sibirica (L.) Don
	Myosotis sylvatica (Ehrh.) Hoffm. "Rosea"
Caprifoliaceae:	Sambucus racemosa L.
Chenopodiaceae:	Chenopodium
Cistaceae:	Helianthemum italicum (L.) Pers.
Compositae:	Anthemis
	Aster alpinus L.
	Cnicus benedictus L.
	Helianthus
	Solidago arguta Ait.
	Tagetes erecta L.
Cruciferae:	Brassica napus L. var. napus
	Isatis
Cucurbitaceae:	Cucurbita
Euphorbiaceae:	Euphorbia dulcis L.
Leguminosae:	Coronilla coronata Wathorst
	Genista tinctoria L.
	Hedysarum hedysaroides (L.) Schinz et Thell

C. albidus:

Papilionaceae:	Phasedus
Polygonaceae:	Polygonum bistorta L.
Rosaceae:	Crataegus viridis L.
	Potentilla fructicosa L.
	Pyracantha coccinea Roem.
Scrophulariaceae:	Mimulus cardinalis Dougl.
	Veronica beccabunga L.
Umbelliferae:	Daucus carota L.
Gramineae:	Glyceria canadensis (Michx.) Trin.

C. albidus zusammen mit C. albidus var. diffluens:

Campanulaceae:	Campanula latifolia L.
Caryophyllaceae:	Melandrium
Polygonaceae:	Rumex pulcher L.
Ranunculaceae:	Nigella arvensis L.
Resedaceae:	Reseda lutea L.

C. albidus zusammen mit C. laurentii:

Caryophyllaceae:	Arenaria fendleri A. Gray

C. albidus var. diffluens:

Caryophyllaceae:	Dianthus deltoides L.
Compositae:	Centaurea bella Trautv.
Cruciferae:	Alyssum saxatile L.
	Iberis umbellata L.
Labiatae:	Origanum vulgare L.

C. albidus var. diffluens:

Moraceae:	Canabis
Ranunculaceae:	Ranunculus acer L.

C. albidus var. diffluens zusammen mit C. laurentii:

Polygonaceae:	Rumex

C. laurentii:

Caryophyllaceae:	Gypsophila paniculata L.
Hydrophyllaceae:	Phacelia tanacetifolia Benth.

C. terreus:

Chenopodiaceae:	Artiplex hortensis L.

Abbildung 5

Samen von Cnicus benedictus L. (Cardobenediktenkraut) mit Cryptococcus albidus A 5 (von Vogelfuttergemisch isoliert) infiziert und 700 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Zur Feststellung von noch wachstumsfähigen C. albidus-Zellen wurde der Samen auf Guizotia abyssinica-Kreatinin-Agar ausgestreut und bei 26°C belassen.

Im Bild: Üppiges Wachstum des geprüften C. albidus-Stammes nach 4 Tagen/26°C in der ganzen Ausdehnung der Samenteile.

2. Untersuchung von Getreide und Getreidestaub aus einem Mühlenbetrieb in Süddeutschland:

In die epidemiologischen Untersuchungen von Pflanzensamen über das Vorkommen vom Erreger der Cryptococcose sollten auch Getreidesorten, die für die Herstellung von Mehl und anderen Lebensmitteln wie auch Tierfutter dienen, einbezogen werden.

Neben den Getreidesorten war der Getreidestaub eines großen Mühlenbetriebes (Uhingen Kreis Göppingen/Württemberg), in dem in- und ausländisches Getreide verarbeitet wird, von besonderem Interesse. Dieser Getreidestaub wird mit Hilfe von Gebläse bei der Reinigung vor dem Mahlprozeß gewonnen.

Die Isolierungsergebnisse sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3

Untersuchung von Getreide und Getreidestaub aus einer Groß-Mühle in Süddeutschland

Untersuchte Proben	Isolierte Cryptococcus-Arten
1A Weizen (BRD)	-
2A Weizen (BRD)	C. laurentii C. albidus
3A Weizenstaub (BRD)	-
4A Weizenstaub (BRD)	-
5A Getreidestaub (BRD)	-
6A Weizenstaub (Canada)	C. albidus C. albidus var. diffluens
7A Weizen (Canada)	-
8A Weizen (BRD)	-
9A Weizen (BRD)	-
10A Gerste (BRD)	-
11A Weizen (BRD)	-
12A Weizen (BRD)	-
13A Weizen (BRD)	-
Gerste	-
Hafer	-
14A Weizen (BRD)	-
15A Gerste (BRD)	-
Hafer	-
16A Gerste (BRD)	-
Hafer	-
17A Gerste (BRD)	-
18A Mais (BRD)	-

Zeichenerklärung: - = Keine Isolierung

Besprechung der Tabelle 3:

Bei den insgesamt 18 untersuchten Proben gelang zweimal die Isolierung apathogener Cryptococcus-Arten. Bei der Probe 2A, aus der C. laurentii zusammen mit C. albidus isoliert werden konnte, handelte es sich um Winterweizen aus Süddeutschland. Die zweite positive Probe 6A war Staub von Canada Western Spring Weizen, der in großen Mengen aus Canada nach Deutschland importiert wurde. Hieraus isolierten wir C. albidus neben C. albidus var. diffluens.

Aus Lebensmittel-hygienischer Sicht (12, 52, 53, 56) war von Interesse, daß C. neoformans weder aus Getreidestaub noch vom Getreide isoliert werden konnte.

3. Überleben von Cryptococcus neoformans und Cryptococcus albidus an Pflanzensamen:

In einem Langzeityersuch sollte geprüft werden, ob die Überlebenszeit von C. neoformans und C. albidus am Samen einzelrer Pflanzenarten variiert.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden 27 Proben verschiedener Pflanzenarten mit dem C. neoformans-Stamm W 71 und dem C. albidus-Stamm A 5 infiziert und nach dem Trocknen bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Ergebnis:

Der geprüfte C. neoformans-Stamm W 71 blieb auf 13 von 27 Samenproben nach einer Aufbewahrungszeit von 700 Tagen noch vermehrungsfähig (s. hierzu Tab. 4). C. albidus A 5 konnte von 10 der 27 infizierten Samenproben isoliert werden.

Abbildung 4

Samen von Rhus typhina L.(Hirschkolben-Sumach) mit Cryptococcus neoformans W 71 infiziert und 700 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Zur Feststellung von noch wachstumsfähigen Zellen von C. neoformans wurde der Samen auf Guizotia abyssinica-Kreatinin-Agar mit Diphenyl-Zusatz ausgestreut und bei 26°C belassen.

Im Bild: An sämtlichen Samenkörnern von Rhus typhina L. blieben die angetrockneten Zellen von C. neoformans W 71 wachstumsfähig. Jedes Samenkorn ist nach 4 Tagen/ 26°C vom Kulturmaterial von C. neoformans umgeben (s. Pfeil). Der Beginn eines Braunfarbeffektes (BFE) ist im Schwarzweiß-Foto nicht zu erkennen.

Beachte: Gehemmtes Wachstum von Fadenpilzen durch den Diphenyl-Zusatz.

Tabelle 4

Überleben von Cryptococcus neoformans und Cryptococcus albidus auf infizierten Pflanzensamen nach 700-tägiger Aufbewahrungszeit bei Zimmertemperatur

Cryptococcus albidus A 5	Cryptococcus neoformans W 71
1. Cnicus benedictus L. (Cardobenediktenkraut)	1. Aristolochia macrophylla (Lam.) (Pfeifenwinde)
2. Tagetes erecta L. (Studentenblume)	2. Aster alpinus L. (Sternblume)
3. Vicia dumetorum L. (Saubohne)	3. Hieracium sabaudum L. (Habichtskraut)
4. Atriplex hortensis L. (Gartenmelde)	4. Hedysarum hedysaroides (L.) Schinz et Thell (Hahnenkopf)
5. Amorpha fruticosa L. (Bastardindigo)	5. Salvia glutinosa L. (Salbei)
6. Coronilla coronata Rathorst (Kronwicke)	6. Phacelia tanacetifolia Benth. (Bienenweide)
7. Coluta orientalis Mill. (Blasenstrauch)	7. Symphoricarpos rotundifolius A. Gray (Schneebeere)
8. Salvia glutinosa L. (Salbei)	8. Ilex decidua Walt. (Winterbeere)
9. Hieracium sabaudum L. (Habichtskraut)	9. Rhus typhina L. (Hirschkolben-Sumach)
10. Lactuca serriola Torner (Sparrigsalat)	10. Calendula arvensis L. (Ackerringel)
	11. Tagetes erecta L. (Studentenblume)
	12. Cnicus benedictus L. (Cardobenediktenkraut)
	13. Amorpha fruticosa L. (Bastardindigo)

4. Über die Austrocknungsresistenz der Cryptococcus-Isolate von Pflanzensamen an trockenem Flußsand:

Da C. neoformans durch eine hohe Austrocknungsresistenz an trockenem Flußsand gekennzeichnet ist (41), interessierte auch, inwieweit die von den Pflanzensamen isolierten apathogenen Cryptococcus-Arten über eine solche Eigenschaft verfügen.

Bei dieser Prüfung wurden 83 Isolate der verschiedenen apathogenen Arten auf Überleben an trockenen Sandkörnern in mit Gummistopfen verschlossenen Reagenzgläsern untersucht.

Ergebnis:

Nur 4 von 83 Cryptococcus-Isolaten waren nach einer Aufbewahrungszeit von 700 Tagen/Zimmertemperatur noch vermehrungsfähig. Hierbei handelte es sich 3 mal um C. albidus und 1 mal um C. albidus var. diffluens.

IV. Diskussion

Da die Gattung Cryptococcus über keine phytopathogenen oder wirtschaftlich interessanten Arten verfügt, wurde ihrem Vorkommen etwa auf pflanzlichem Material keine Beachtung geschenkt.

An Pflanzensamen wie z.B. Getreide, können besonders Fadenpilze in Abhängigkeit von Lagerung, Feuchtigkeit u.a. zur Ansiedlung gelangen (10, 11, 20).

HESSELTINE and GRAVES (20) hatten bei ihren Untersuchungen über die Mikroflora bei der Zersetzung toten pflanzlichen Materials die isolierten Hefen nicht identifiziert. Bei Sproßpilzen aus feuchten Getreidesilos handelte es sich nach BURMEISTER and HARTMAN (7) überwiegend um Hansenula anomala und Candida krusei. LACEY (25) fand bei solchen Untersuchungen Endomycopsis chodatii und Hansenula spec..

Solche Sproßpilzisolierungen können durch konkurrierendes Wachstum anderer Pilze sehr erschwert sein. Deshalb war wegen des oft reichlichen Vorkommens von Hyphomyceten an Pflanzensamen und ihres störenden Wachstums auf festen Nährböden für unsere gezielte Suche nach Cryptococcus-Arten, die durch langsames Wachstum gekennzeichnet sind, der Diphenyl-Zusatz zum Guizotia abyssinica-Kreatinin-Agar von besonderem Wert (46).

Unter diesen optimalen Voraussetzungen zur Isolierung von C. neoformans konnte erstmals an einem umfangreichen Untersuchungsmaterial festgestellt werden, daß an Pflanzensamen dieser Krankheitserreger nicht nachweisbar ist so wie etwa in Vogelfäkalien. Die hierbei häufigst nachgewiesene Cryptococcus-Art war C. albidus (71 %); die übrigen Arten waren C. albidus var. diffluens (21 %), C. laurentii (6,5 %) und C. terreus (1,5 %) (3, 31, 38).

KURTZMAN, WICKERHAM and HESSELTINE (25) fanden bei ihren umfangreichen Untersuchungen von kanadischem Weizen einschließlich Mehl, fast ausschließlich C. albidus; daneben konnten sie C. laurentii nur vereinzelt isolieren. Sie waren deshalb der Meinung, daß es sich somit bei Weizen um einen besonderen Standort von C. albidus handeln würde. Aufgrund unserer Befunde ist der Weizen kein besonderer Standort für C. albidus, denn es gelang der Nachweis dieser Spezies bei Samenproben von 30 Pflanzenarten. Auch BRANDSBERG (6, 24) gelang es nicht, C. neoformans aus Vogelfutter (einem nicht weiter definierten Samengemisch) zu isolieren. Bei diesen Untersuchungen fand er C. albidus, C. albidus var. diffluens, C. laurentii und C. luteolus.

PHAFF and FELL (31) sind aufgrund ihrer Untersuchungen der Meinung, daß C. albidus weltweit verbreitet sei, und zwar auf dem Land wie auch im Meerwasser. Dabei fanden sie

C. albidus var. diffluens überwiegend auf dem Land (3).

Aufgrund unserer hier zu diskutierenden Befunde muß angenommen werden, daß der Vogel C. neoformans nicht über Pflanzensamen in sich aufnimmt. STAIB (40) hatte erstmals die Frage gestellt, über welches Futter C. neoformans über die Darmpassage in die Fäkalien des Vogels gelangt. Er bot den Kanarienvögeln Körnerfutter, das mit C. neoformans infiziert war an, und konnte wenige Stunden später diesen Erreger in den frisch abgesetzten Fäkalien, die als Standort (außerhalb des Körpers) gelten, nachweisen (38).

Wie in der Einleitung darauf hingewiesen, war wegen der Verbreitung von C. neoformans in Vogelfäkalien und seiner besonderen Eigenschaften wie Osmotoleranz und Austrocknungsresistenz (41) anzunehmen, daß er auch zumindest in einer Art Ruheform an Pflanzensamen vorkommen könnte. Diese Vermutung war noch bestärkt durch die Beobachtungen von STAIB, THIELKE, RANDHAWA et al. (49) über das Wachstum von C. neoformans in abgestorbenem pflanzlichen Material. Sie konnten auch histologisch bei Gramineen zeigen, wie sich C. neoformans als sprossende Zelle im Bereich der Spaltöffnungen und in den Epidermiszellen vermehrt.

Der fehlende Nachweis von C. neoformans an Pflanzensamen deckt sich auch mit den Beobachtungen bei der lebenden Wespe

(55) und beim verlassenen Wespennest (19). Aus diesem Material wurden ebenfalls nur apathogene Cryptococcus-Arten isoliert. Allerdings wurde bei diesen Untersuchungen C. laurentii am häufigsten nachgewiesen. Auch hierbei stellte sich die Frage, ob u.U. wachstumshemmende Einflüsse für das Fehlen von C. neoformans verantwortlich zu machen sind. So wurde zum Beispiel diskutiert, ob auch bei der Wespe so wie bei der Biene antibiotische Stoffe, wie sie im Bienenkitt vorkommen, möglich sind (19). HUBALEK und PRIKAZSKY (21) stellten fest, daß durch direkte Sonnenbestrahlung C. neoformans gehemmt wird. Diese Prüfungen führten sie mit Vogelfäkalien durch. Sie machen die direkte und indirekte Wirkung von ultraviolettem Licht für den fehlenden Nachweis von C. neoformans in solchem Material verantwortlich. Inwieweit die UV-Bestrahlung für den fehlenden Nachweis von C. neoformans an Pflanzensamen verantwortlich gemacht werden kann, müßte geprüft werden. Gegen die Bedeutung der UV-Bestrahlung sprechen die Befunde von STAIB (41), der von künstlich infiziertem und anschließend sonnengetrocknetem Flußsand den geprüften C. neoformans-Stamm noch nach Jahren isolieren konnte.

Nachdem wir vom künstlich infizierten Samen verschiedener Pflanzen den geprüften C. neoformans-Stamm noch nach einer Aufbewahrungszeit von 700 Tagen isolieren konnten, ist belegt, daß C. neoformans an einem Samenkorn noch Jahre ver-

mehrungsfähig bleiben kann (s. Abb. 1-5).

Abschließend sei zu diesem bisher unerklärbaren Fehlen von C. neoformans an Pflanzensamen in Anlehnung an jüngste Beobachtungen von STAIB, MISHRA und GROSSE (54) spekulativ Stellung genommen. Sie zeigten, daß ein bestimmter Pilzstamm, der auf SABOURAUD-Dextrose-Agar Myzel und Pseudomycel bildet, auf einem Nährboden mit Harnsäure als einziger Stickstoffquelle, seine Myzel- und Pseudomyzelbildung einstellte und sich hierbei nur durch Sprossung vermehrt und darüber hinaus gleichzeitig Kapseln bildet, wie sie für C. neoformans besonders im Wirtsgewebe typisch sind. Aufgrund dieser Beobachtung schließen sie nicht aus, daß C. neoformans in der Natur auch in der nicht herkömmlichen Wuchsform existieren kann.

Diese Erwägungen könnten zu den Vermutungen von SHADOMY (17, 37) passen, daß C. neoformans ein Basidiomycet sei. Ob diese jüngsten Befunde über die Morphogenese von C. neoformans uns auch bei der Suche nach diesem Pilz an pflanzlicher Material weiterhelfen wird, muß abgewartet werden.

V. Zusammenfassung

1. Die Frage, ob der Vogel den Erreger der Cryptococcose des Menschen, Cryptococcus neoformans, mit dem Futter in Form von Pflanzensamen in sich aufnimmt, muß aufgrund der Untersuchung von Samen 117 verschiedener Pflanzenarten verneint werden.

2. Bei 47 von 117 Proben gelang ein Nachweis folgender apathogener Arten der Gattung Cryptococcus: (Zahl der Isolierungen in Klammern)
C. albidus (30); C. albidus zus. mit C. albidus var. diffluens (5); C. albidus zus. mit C. laurentii (1); C. albidus var. diffluens (7); C. albidus var. diffluens zus. mit C. laurentii (1); C. laurentii (2); C. terreus (1).

3. Die Verteilung der nachgewiesenen Cryptococcus-Arten auf die untersuchten Pflanzensamen war wie folgt :
C. albidus: Aizoaceae, Amaranthaceae, Boraginaceae, Campanulaceae, Caprifoliaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Cistaceae, Compositae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Gramineae, Leguminosae, Polygonaceae, Papilionaceae, Ranunculaceae, Resedaceae, Rosaceae, Scrophulariaceae, Umbelliferae.
C. albidus var. diffluens: Campanulaceae, Caryophyllaceae, Compositae, Cruciferae, Labiatae, Moraceae, Polygonaceae, Ranunculaceae, Resedaceae.

C. laurentii: Caryophyllaceae, Polygonaceae.
C. terreus: Chenopodiaceae.

4. Aus vier Vogelfuttergemischen, die aus verschiedenen Pflanzensamen bestehen, konnte ebenfalls C. neoformans nicht isoliert werden: es gelang nur der Nachweis apathogener Cryptococcus-Arten.

5. Proben von Brotgetreide und Getreidestaub (insgesamt 18) einer Großmühle in Süddeutschland waren frei von C. neoformans; nachgewiesen wurden apathogene Cryptococcus-Arten.

6. Von Pflanzensamen, die mit einem C. neoformans-Stamm, der auf einem künstlichen Nährboden vorgezüchtet war, infiziert wurden, gelang die Reisolierung des Erregers noch nach 700-tägiger Aufbewahrungszeit bei Zimmertemperatur.

7. Die eigenen Befunde über die vergebliche Suche nach C. neoformans am Pflanzensamen, die sich mit den Ergebnissen anderer decken, werden im Zusammenhang mit jüngsten Vermutungen über die systematische Stellung von C. neoformans diskutiert.

Literaturverzeichnis

1. AJELLO,L.: OCCURRENCE OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS IN SOILS
Amer.J.Hyg. 67 (1958) 72

2. AJELLO,L.: COMPARATIVE ECOLOGY OF RESPIRATORY MYCOTIC DISEASE AGENTS.
Bact.Rev. 31 (1967) 6

3. AKSENOW,S.J., BABYEVA,J.P. and GOLUBEV,V.J.: STUDIES OF PROCESSES OF MOISTENING AND DRYING OF CAPSULATED AND NON-CAPSULATED FORMS OF CRYPTOCOCCUS ALBIDUS VAR. DIFFLUENS BY SPIN-ECHO NMR METHOD.
Izv.Akad.Nauk.SSSR., Ser.biolog. 4 (1971)

4. BARTSCH,A. und SCHAIP,F.: ZUM BRAUNFÄRBEEFFEKT BEI CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS DURCH INHALTSSTOFFE VON PFLANZENSAMEN.
Naturwiss. 52 (1965) 477

5. BEIJERINCK,M.W.: L'AUXANOGRAPHIE, OU LA METHODE DE L'HYDRODIFFUSION DANS LA GELATINE APPLIQUEE AUX RECHERCHES MICROBIOLOGIQUES.
Arch.néerl.Sci. 23 (1889) 367

6. BRANDSBERG,J.W. and KRETSCHMER,P.J.: CRYPTOCOCCI OF COMMERCIAL BIRD FEEDS.
Sabouraudia 10 (1972) 43-46

7. FUNNELLER,H.R. and HARTMAN,P.A.: YEASTS IN ENSILED HIGH-MOISTURE CORN.
Appl.Microbiol. 14 (1966)

8. LOSSE,C.: ÜBER PARASITÄRE ZELLEINSCHLÜSSE UND IHRE ZÜCHTUNG.
Zbl.Bakt.,I.Abt.Orig. 16 (1894) 175-180

9. LOSSE,C.: DIE HEFEN ALS KRANKHEITSERREGER.
Hirschwald, Berlin (1897)

10. CHRISTENSEN,C.M. and SCHOEN,L.: NUMBER, KINDS AND SOURCE OF MOLDS IN FLOUR.
Cereal Chem. 27 (1950) 178-185

11. CHRISTENSEN,C.J.: FUNGI ON AND IN WHEAT SEED.
Cereal Chem. 28 (1951) 402-415

12. CLARC,D.S., WALLACE,R.H. and DAVID,J.J.: YEASTS OCCURING ON APPLES AND IN APPLE CIDER. Canad.J.Microbiol. 1 (1954) 145-149

13. DI MENNA,M.E.: A SEARCH FOR PATHOGENIC SPECIES OF YEASTS IN NEW ZEALAND SOILS. J.gen.Microbiol. 12 (1955) 54-62

14. DI MENNA,M.E.: CANDIDA ALBICANS FROM GRASS LEAVES. Nature 4618, Mai (1958)

15. EMMONS,C.W.: ISOLATION OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS FROM SOIL. J.Bact. 62 (1951)

16. EMMONS,C.W.: SAPROPHYTIC SOURCES OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS ASSOCIATED WITH THE PIGEON. Am.J.Hyg. 62 (1955) 227-232

17. EMMONS,C.W., BINFORD,C.H. and UTZ,J.P.: MEDICAL MYCOLOGY. Lea and Febiger, Philadelphia (1970)

18. GÖPP,K., ZAAKE,S. and HERTZSCH,V.: DER EINFLUß VON MIKROORGANISMEN AUF DIE LAGERUNG UND VERMÄLZUNG VON BRAUGERSTE. Monatsschrift f. Brauerei 6 (1971) 153-160

19. GRAVE,P.: ÜBER DIE SUCHE NACH CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS IM WESPENNEST (DOLICHO-VESPULA SAXONICA) EIN BEITRAG ZUR ÖKOLOGIE UND EPIDEMIOLOGIE VON ARTEN DER GATTUNG CRYPTOCOCCUS. Dissertation 1975, Freie Universität Berlin

20. MESSELTINE,C.W. and GRAVES,R.R.: MICROBIOLOGY OF FLOURS. Econ.Bot. 20 (1966) 156-169

21. HUDALEK,Z. and PRIKAZSKY,Z.: GROWTH OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS IN UV-IRRADIATED EXCRETA OF PIGEONS. Folia microbiol. (Prague) 20 (1975) 231-235

22. KAO,C.J. and SCHWARZ,J.: THE ISOLATION OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS FROM PIGEON NESTS WITH REMARKS ON THE IDENTIFICATION OF VIRULENT CRYPTOCOCCI. Amer.J.Clin.Path. 27 (1957) 652-663

23. KAPLAN,W., AJELLO,L., DIBIBETTO,D.B. and McDONOUGH,E.S.: THE DISCOVERY OF HISTOPLASMA CAPSULATUM IN CONNECTICUT SOIL INCIDENTAL TO THE INVESTIGATION OF A CASE OF FELINE CRYPTOCOCCOSIS. Mycopathologia 14 (1961) 1-8

24. KRETSCHMER,P.B. and BRANDSBERG,J.W.: CRYPTOCOCCI OF COMMERCIAL BIRD FEEDS. II. CRYPTOCOCCUS SPP. IN ASSOCIATION WITH MILO (SORGHUL VULGARE VAR. SUBGLABRESCENS). Sabouraudia 11 (1975) 30-32

25. KURTZMAN,C.P., WICKERHAM,L.J. and NESSELTINE,C.W.: YEASTS FROM WHEAT AND FLOUR. Mycologia 62 (1970) 542-547

26. LACEY,J.: THE MICROBIOLOGY OF MOIST BURLEY STORAGE IN UNSEALED SILOS. Ann.appl.Biol. 69 (1971) 187-212

27. LODDER,J. and KREGER-VAN-RIJ,N.J.W.: THE YEASTS. North Holland Publ.Comp., Amsterdam (1967)

28. LODDER,J.: THE YEASTS, A TAXONOMIC STUDY. North Holland Publ. Comp., Amsterdam (1970)

29. McDONOUGH,E.S., AJELLO,L., AUSHERMAN,R.J., BALOWS,A., McCLELLAN,J. and BRINKMAN,S.: HUMAN PATHOGENIC FUNGI RECOVERED FROM SOIL IN AN AREA ENDEMIC FOR NORTH AMERICAN BLASTOMYCOSIS. Amer.J.Hyg. 73 (1961) 75-83

30. MUCHMORE,H.G., RHOADES,E.R., NIX,G.E., FELTON,F.G. and CARPENTER,R.E.: OCCURENCE OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS IN THE ENVIRONMENT OF THREE GEOGRAPHICALLY ASSOCIATED CASES OF CRYPTOCOCCAL MENINGITIS. New.Engl.J.Med. 268 (1963) 1112

31. PHAFF,H.J. and FELL,W.: CRYPTOCOCCUS. In: The YEASTS. Edit.J. LODDER, North Holland Publ. Comp., Amsterdam, London (1970)

32. RANDHAWA,A.S., CLAYTON,Y.M. and RIDDELL,R.W.: ISOLATION OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS FROM PIGEON HABITATS IN LONDON. Nature 208 (1965) 801

33. SANFELICE,F.: ÜBER EINE FÜR TIERE PATHOGENE SPROßPILZART UND ÜBER DIE MORPHOLOGISCHE ÜBEREINSTIMMUNG, WELCHE SIE BEI IHREM VORKOMMEN IN DEN GEWEBEN MIT DEN VERMEINTLICHEN KREBSCOCCIDIEN ZEIGT. Z.Hyg.Infect.-Kr. 17 (1895) 113

34. SCHNEIDAU,J.D.Jun.: PIGEONS AND CRYPTOCOCCOSIS. Science 143 (1964) 525

35. SEELIGER,H.P.R. und STAIB,F.: KLINISCH-EPIDEMIOLOGISCHE PROBLEME DER CRYPTOCOCCOSE. Fortschr.Med. 84 (1966) 436

36. SETHI,K.K., RANDHAWA,H.S., ABRAHAM,S., MISHRA,S.K. and DAMODARAN,V.N.: OCCURRENCE OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS IN PIGEON EXCRETA IN DELHI. Indian J.Chest.Dis. 8 (1966) 207

37. STADOMY,W.J.: CLAMP CONNECTIONS IN TWO STRAINS OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS. In:"Recent trends on yeasts research", (D.G. ANEARN, edit.), pp. 67-72 (1970) Georgia State Univ. Atlanta

38. STAIB,F.: VOGELKOT,EIN NÄHRSUBSTRAT FÜR DIE GATTUNG CRYPTOCOCCUS. Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig. 196 (1962) 233-247

39. STAIB,F.: CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS UND GUIZOTIA ABYSSINICA (SYN. G. OLEIFERA D.C.). Zeitschr. Hyg. 148 (1962) 466

40. STAIB,F.: CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS BEIM KANARIENVOGEL. Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig. 196 (1962) 129-134

41. STAIB,F.: ZUR WIDERSTANDSFÄHIGKEIT VON CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS GEGEN AUSTROCKNUNG UND HOHE TEMPERATUREN. Arc.Mikrobiol. 44 (1963) 323-333

42. STAIB,F.: NEW CONCEPTS IN THE OCCURRENCE AND IDENTIFICATION OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS. Mycopathologia 19 (1963) 143

43. STAIB,F. DAS SERUM-RESTSTICKSTOFF-AUXANOGRAMM (MIT SPROß- UND SCHIMMELPILZEN). Zbl.Bakt.,I.Abt.Orig. 194 (1964) 379

44. STAIB,F.: ZUR CRYPTOCOCCOSE BEI MENSCH UND TIER UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DES VORKOMMENS VON CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS IM VOGELMIST. Tierärztl.Umschau 19 (1964) 69

45. STAIB,F.: SAPROPHYTIC LIFE OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS. ITS RELATION TO LOW MOLECULAR NITROGEN SUBSTANCES IN NATURE AND THE HUMAN. Ann.Soc.Belge Med.trop. 44 (1964) 611

46. STAIB,F. und SEELIGER,H.P.R.: UN NOUVEAU MILIEU SÉLECTIF POUR L'ISOLEMENT DE C.NEOFORMANS DES MATERIÈRES FÉCALES ET DU SOL. Ann.Inst.Pasteur 110 (1966) 792-793

47. STAIB,F.und BETHÄUSER,G.: ZUM NACHWEIS VON CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS IM STAUB VON EINEM TAUBENSCHLAG. mykosen 11 (1968) 619-624

48. STAIB,F.: PFLANZEN ALS NÄHRSUBSTRAT FÜR CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS. Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig. A 218 (1971) 486-495

49. STAIB,F., TIELKE,Ch., RANDHAWA,H.S., SENSKA,M. and KULINS,G.: COLONISATION OF DEAD PLANTS BY CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS. Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig. A 222 (1972) 115-125

50. STAIB,F., BREYER,D., KULINS,G., SENSKA,M. und WULKOW,R.: NEU, EIN NÄHRSUBSTRAT FÜR CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS. Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig. A 222 (1972) 407-414

51. STAIB,F. und ALTMANN,L.: ZUM VORKOMMEN VON ARTEN DER GATTUNG CRYPTOCOCCUS AUF PFLANZENSAMEN. Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig. A 223 (1973) 140-142

52. STAIB,F., RANDHAWA,H.S., SENSKA,M., BLISSE,A. und WULKOW,R.: PFIRSICH UND PFIRSICHSAFT ALS NÄHRSUBSTRAT FÜR CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS (STELLUNGNAHME ZU BEOBACHTUNGEN VON F. SANFELICE IM JAHRE 1894). Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig. A 224 (1973) 120-127

53. STAIB,F., SENSKA,M. und WULKOW,R.: APFEL UND APFELSAFT ALS NÄHRSUBSTRAT FÜR CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS. Zbl.Bakt., Abt. II. 129 (1974) 286-293

54. STAIB,F., MISHRA,S.K. and GROSSE,G.: SELECTIVE INVOLVEMENT OF THE BRAIN IN EXPERIMENTAL CRYPTOCOCCOSIS. VIth Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, June 29 - July 4, 1975, Tokyo, Japan, im Druck

55. STAIB,F., GRAVE,B., LIEBMANN,S. und SCHMID-HÖHNE,E.-M.: PILZE UND BAKTERIEN BEI WESPEN EINER BÄCKEREI. EPIDEMIOLOGISCHE UND ÖKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN. In Vorbereitung.

56. WILLIAMS,A.J., WALLACE,R.H. and CLARC,D.S.: CHANGES IN THE YEASTS POPULATION ON QUEBEC APPLES DURING RIPENING. Canad.J.Microbiol. 2 (1956) 645-648

Herrn Prof. Dr.med.,Dr.med vet. F. STAIB möchte ich für die Überlassung des Themas, seinen unermüdlichen Rat und Beistand bei der Abfassung dieser Dissertation herzlich danken.

Für die freundliche Überlassung der Pflanzensamen danke ich Frau Prof. Dr. Ch. THIELKE vom Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin und Herrn Prof. Dr. Th. ECKARDT, Leitender Direktor des Botanischen Gartens und Botanischen Museums von Berlin West.

Lebenslauf

Lutz Altmann

geb. am 19.7.1946 in Berlin

Eltern : Dr.med. Heinz Altmann und Helene Altmann
geb. Blasy

1954 - 1957 Konkordia Grundschule in Berlin-Spandau

1957 - 1959 Ernst-Ludwig-Heim-Schule in Berlin-Spandau

1959 - 1968 Kant-Gymnasium in Berlin-Spandau

1968 Abitur

1968 - 1974 Medizinstudium an der Freien Universität Berlin

1972 Eheschließung mit Frau Dr.med. Gudrun Altmann
geb. Grühn

1973 Geburt meiner Tochter Julia

1974 Medizinisches Staatsexamen in Berlin

1975 Geburt meiner Tochter Sarah

1975 Approbation als Arzt

seit 1975 Assistenzarzt auf der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe im St. Marienhospital in Lünen/Westfalen.

Fred Höpfner · Dissertationsdruck · Pestalozzistraße 106 · 1000 Berlin 12
Tel.: 3128885 · 3138198